

Diversidad y actividad procariótica en ecosistemas marinos

A. López López, M. Zaballos

División de Microbiología y Grupo de Genómica Evolutiva, Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan. 03550 San Juan de Alicante, Alicante. España

La historia evolutiva de los microorganismos se remonta a más de 3500 millones de años y una parte importante de ésta ha ocurrido en el medio marino. Desde entonces, los microorganismos constituyen un componente esencial de las redes tróficas de los ecosistemas marinos, con una gran abundancia y biomasa, contribuyendo a la regeneración de nutrientes e interactuando con una amplia gama de organismos. Dado que un 70% de la superficie global del planeta corresponde a masas de agua y que la profundidad media de los océanos es de 4000 m, es obvio que el estudio de las comunidades procarióticas presentes en este ambiente tiene una enorme relevancia en cuanto al conocimiento de la diversidad biológica global y de los ciclos biogeoquímicos que tienen lugar en nuestro planeta. Es cierto que la densidad de las poblaciones procarióticas decrece significativamente con la profundidad pero sin embargo, integrando todos los datos para el total de la columna de agua, el océano contiene más células procarióticas que cualquier otro hábitat acuático siendo, por unidad de biomasa, más productivo que los ecosistemas terrestres.

The evolutionary history of the microorganisms goes back to 3.5 billions of years and it happened mainly in the marine environment. Microorganisms are essential components of the food webs in these ecosystems because they contribute to the nutrient regeneration and interact with a huge variety of organisms. Since nearly 70% of the total content of our planet correspond to marine water masses and taking into account that the average depth in the oceans is around 4000 m, it is clear that the study of the prokaryotic communities present in this environment have an important relevance for the knowledge of the global biological diversity and the biogeochemical cycles that take place in our planet. It is known that the prokaryotic population density decreases significantly with depth, however integrating the figures for the whole water column, the deep ocean contains more prokaryotic cells than any other aquatic habitat being, per unit of biomass, more productive than terrestrial ecosystems.

Importancia ecológica de los microorganismos en medios marinos

Microorganismo es un término que incluye distintas formas de vida que comparten la característica común de tener un tamaño menor de 200 μm (**Fig. 1**). Estas formas de vida pueden pertenecer a cualquiera de los tres dominios de la vida que existen en nuestro planeta, *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* (Woese et al., 1990), e incluye desde procariotas (bacterias y arqueas) hasta eucariotas (algas y protistas fagotrofos), tanto autótrofos como heterótrofos. Asimismo, se incluyen dentro del ámbito de estudio de la Microbiología los virus y otros agentes subvíricos que no presentan estructura celular.

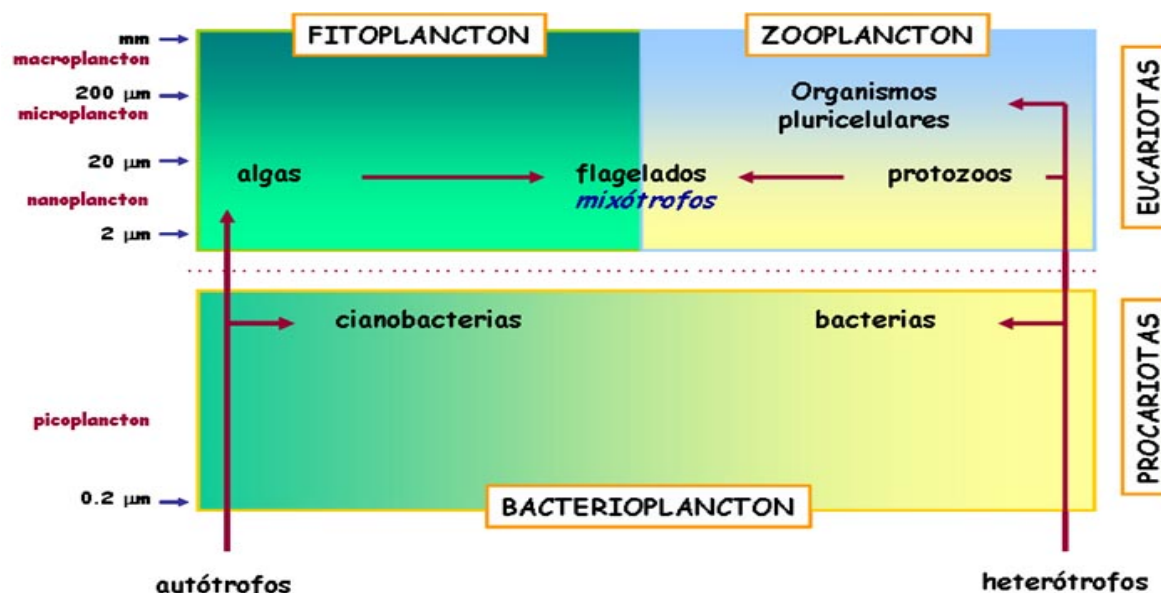


Figura 1. Tamaño e interrelaciones de los grupos generales de microorganismos pelágicos.

Morfológicamente los procariotas marinos son simples: cocos o bacilos y filamentos normalmente menores de 1-2 μm (**Fig. 2**) y, sin embargo son muy diversos en cuanto a taxonomía y fisiología. Aunque existen excepciones, en la mayor parte de los casos organismos que están relacionados filogenéticamente presentan muy distintos tipos de metabolismo (Fenchel and Blackburn, 1998), y es esta versatilidad fisiológica la que les ha permitido colonizar muy distintos tipos de hábitats.

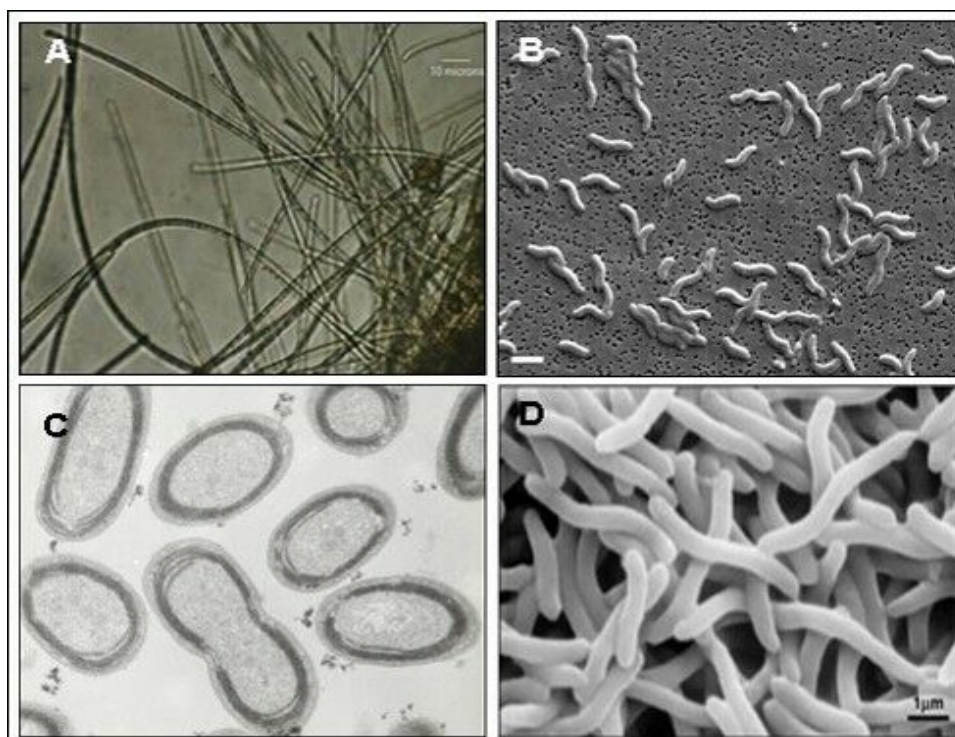


Figura 2. Fotografías tomadas con el microscopio electrónico de transmisión en la que se aprecian algunas morfologías típicas de los procariotas marinos. A) Células pertenecientes al género bacteriano *Beggiatoa*, típica de sedimentos marinos. B) Células de la bacteria *Thalassospira lucentensis*, aislada por primera vez a partir de muestras marinas tomadas en las costas de Alicante. C) Células del microorganismo fitoplanctónico *Prochlorococcus marinus* en proceso de división. En los bordes de estas células se pueden visualizar las membranas fotosintéticas. D) Células de la especie *Rhodospirillum rubrum*.

El concepto del papel ecológico de los microorganismos en el ecosistema marino ha ido evolucionando desde los primeros estudios al respecto. En un principio se estableció que la transformación de la materia y energía se realizaba a través de una cadena alimenticia constituida por diatomeas, krill y grandes predadores, pero con el avance de la Microbiología y los estudios realizados sobre producción primaria en el medio marino, se demostró que eran los microorganismos los que estaban en la base y el final de la anteriormente llamada cadena alimenticia, que pasó entonces a denominarse red trófica (Fig. 3).

Dentro de esta comunidad microbiana las bacterias heterótrofas constituyen, después de los virus, la población más numerosa (Dortch and Packard, 1989; Marie et al., 1999) y llevan a cabo funciones de importancia fundamental ya que controlan los flujos de nutrientes en el sistema a través de la mineralización de la materia orgánica (Furhman y Azam, 1982; Azam et al., 1983; Schut et al., 1997) y la producción secundaria de carbono (Azam et al., 1983). Además, son capaces de utilizar la materia orgánica disuelta (MOD) que deriva de los organismos autótrofos y de la actividad metabólica de otros organismos heterótrofos de mayores dimensiones presentes en el ambiente pelágico.

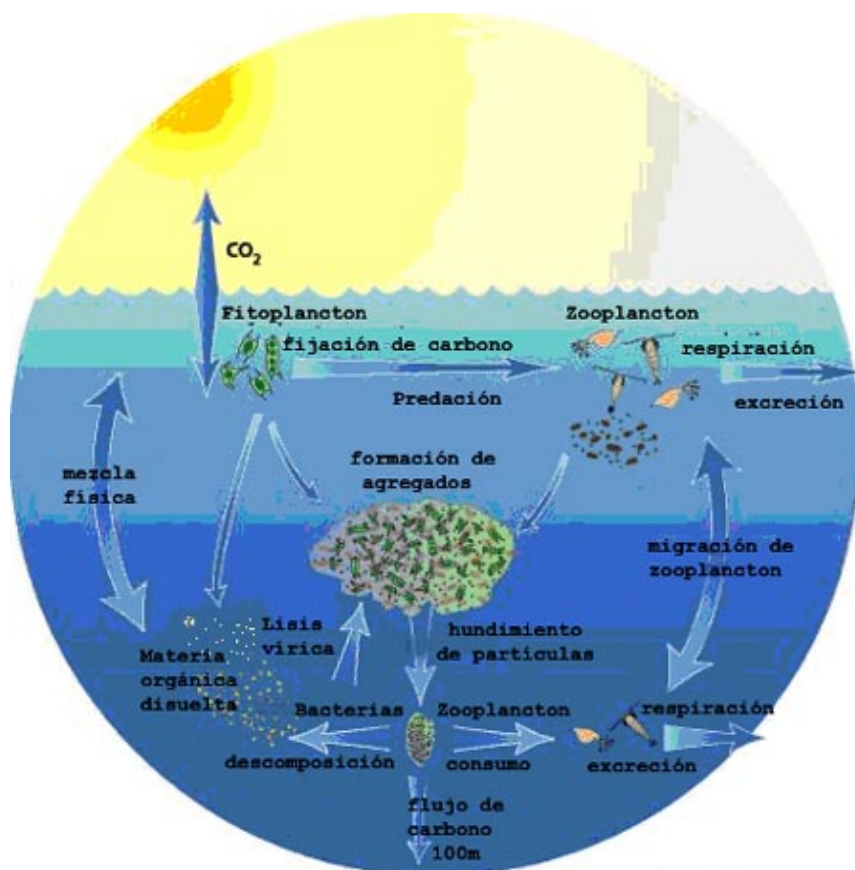


Figura 3. Esquema de la parte de la red trófica oceánica en la que los microorganismos juegan un papel fundamental.

Diversidad de los procariotas marinos

La historia de todos los organismos es la historia sobre los retos y oportunidades que han ido apareciendo durante la evolución de la biosfera, y es también la historia de adaptaciones, competencia y de innovaciones en estructura y función. El océano es probablemente el ecosistema más grande y más antiguo del planeta y hoy en día el éxito del bacterioplancton se puede medir en términos de abundancia o por la cantidad de nutrientes (carbono, nitrógeno o fósforo) que utiliza. Pero determinar la enorme diversidad filogenética y ecológica del mundo procariótico, y más aún cuantificar su abundancia en medios naturales, requiere estudios basados en secuencias de DNA. En organismos superiores la identificación y clasificación de las especies, su distribución geográfica y su especialización en ciertos hábitats o nichos ecológicos normalmente proviene de la observación directa de los mismos y de su comportamiento, pero en microorganismos y

particularmente en procariotas, esta información es mucho más difícil de obtener. Desde el pasado siglo se han aislado multitud de bacterias marinas, y aún hoy en día existe controversia sobre la representatividad de estos aislados frente al total de bacterias autóctonas. La opinión más generalizada es que la proporción de microorganismos aislados con respecto al global es una fracción pequeña y poco representativa de la comunidad microbiana presente en el medio natural (Giovannoni et al., 1990; Schmidt et al., 1991; Suzuki et al., 1997), aunque existen trabajos puntuales en los que se demuestra lo contrario (Rehnstam et al., 1993; Furhman et al., 1994; Pinhassi et al., 1997). En los últimos años, la aplicación de métodos y medios de cultivo innovadores que recrean de manera más eficiente las condiciones físico-químicas encontradas en el medio marino ha permitido el crecimiento en laboratorio de bacterias incapaces de crecer en los medios artificiales ricos en materia orgánica que tradicionalmente se venían utilizando para el aislamiento de procariotas marinos (Button et al., 1993; Bianchi y Giuliano, 1996; Schut et al., 1997; Rappé et al., 2002). Este hecho tiene su lógica si pensamos que los nichos en los que se desarrollan estas bacterias son principalmente oligotróficos, y por tanto están adaptadas a la vida en ambientes con concentraciones bajas de nutrientes (Morita, 1982; Fry, 1990).

Por diversos motivos, hoy en día todavía no es posible el aislamiento y crecimiento en cultivo puro de la mayor parte de los procariotas presentes en el medio marino (Rappe y Giovannoni, 2003) y por esta razón el complemento ideal para estudiar la diversidad microbiana en ambientes naturales en general, y marinos en particular, es el estudio de genes que pueden ser directamente amplificados a partir de la biomasa procariótica presente en la muestra. La amplificación mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) (Mullis et al., 1986) de moléculas filogenéticamente informativas abrió nuevas perspectivas en cuanto al establecimiento de las relaciones evolutivas y la diversidad procariótica existente en nuestro planeta (Olsen et al., 1986; Woese et al., 1990; Pace, 1997). Las primeras aproximaciones para determinar las relaciones evolutivas entre distintos organismos consistían en la comparación de sus genomas utilizando la técnica de hibridación DNA-DNA, pero fue la utilización de los genes ribosómicos (rDNA 16S en procariotas y rDNA 18S en eucariotas) lo que simplificó en gran manera el problema, ya que secuencias relativamente cortas se pudieron utilizar para clasificar y ordenar filogenéticamente a gran diversidad de organismos. Fue a partir de entonces cuando se determinó que el valor de 70% en la hibridación DNA-DNA podía equipararse a una similitud del 97% en el gen de rRNA 16S, por lo que se tomó este valor como referencia para asignar distintos microorganismos a una misma especie (Stackebrandt y Goebel, 1994). En los años 80 se empezaron a considerar las secuencias de rRNA como aptas para caracterizar comunidades procarióticas naturales, sin necesidad de obtener cultivos puros (Olsen et al., 1986; Pace, 1986). En la década de los 90 se aplicaron las técnicas moleculares para el estudio de muestras marinas (Schmidt et al., 1991; DeLong, 1992; Furhman et al., 1994; Giovannoni et al., 1996; Suzuki et al., 1997; Acinas et al., 1999) y se puso de manifiesto que existía una gran diversidad microbiana que hasta entonces nos era totalmente desconocida, puesto que la mayor parte de las secuencias que se obtenían a partir de la biomasa microbiana recolectada en medios marinos no se correspondía con las obtenidas a partir de especies cultivadas y estudiadas en laboratorio.

Uno de los mayores logros de la aplicación de estas técnicas moleculares al estudio de la microbiología marina durante la última década ha sido el aislamiento y crecimiento en cultivo puro de la bacteria marina *Pelagibacter ubique* (anteriormente conocida como Grupo SAR11). La existencia de este microorganismo fue descrita a principios de la década de los 90 en muestras de superficie del Mar de los Sargazos (Giovannoni et al., 1990) mediante la aplicación de técnicas moleculares basadas en la clonación y secuenciación de genes ribosomales. El Grupo SAR11 es uno de los filotipos (secuencia de rDNA 16S obtenida del medio ambiente sin cultivo previo) más importantes, debido a su abundancia, del ecosistema marino y sin embargo no se tuvo constancia de su existencia hasta la aplicación estas técnicas. Posteriormente se constató su presencia en prácticamente todas las muestras marinas que se estudiaban mediante esta aproximación (Furhman et al., 1994; Field et al., 1997; López-García et al., 2001; Bano y Hollibaugh, 2002; Morris et al., 2002). Un estudio reciente realizado para su cuantificación en el medio natural concluyó que este grupo bacteriano podía constituir alrededor de un tercio de la población procariótica total presente en el bacterioplancton marino (Morris et al., 2002). Los autores estimaron que el número global de células pertenecientes a esta especie en medios oceánicos podría ser de 2.4×10^{28} , lo que lleva a la conclusión de que se trata de uno de los organismos vivos más abundantes y exitosos del planeta. Más de una década después de su detección inicial se consiguió su aislamiento y cultivo en laboratorio (Rappé et al., 2002) mediante la utilización de técnicas de cultivo de alto rendimiento (Connon y Giovannoni, 2002) en combinación con otras técnicas moleculares.

La utilización de estas técnicas también supuso una revolución con respecto al conocimiento de las arqueas marinas ya que, hasta entonces, se creía que el desarrollo de éstas en el medio marino estaba restringido a ambientes extremos tales como sedimentos anaeróbicos o intestino de animales, surgencias termales o fumarolas de aguas profundas, y ambientes con elevada salinidad (DeLong, 1992; Furhman et al., 1992; Massana et al., 1997). Más tarde se demostró que las arqueas marinas eran realmente abundantes (DeLong, 1992; Massana et al., 1997; DeLong et al., 1999; Karner et al., 2001) y que pertenecían mayoritariamente a los grupos *Euryarchaea* y *Crenarchaea*. Actualmente sólo existe un arquea marina que ha podido ser cultivada en laboratorio. Este microorganismo, denominado *Cenarchaeum symbiosum*, se encontró en los tejidos de la esponja marina *Axinella mexicana* (Preston et al., 1996) y hasta la fecha, es la única arquea marina no extremófila que ha podido cultivarse a partir de muestras marinas. Es pues uno de los retos más importantes de la microbiología marina el poder aislar y conocer con más detalle representantes de este importante grupo de microorganismos que podrían tener papeles ecológicos relevantes en el medio marino (DeLong, 2003).

Uno de los trabajos más importantes relacionado con la abundancia y distribución de los procariotas marinos mostró que la población bacteriana representaba un 90% del total de la biomasa procariótica en muestras de superficie (por encima de 150 m de profundidad), y que su abundancia relativa decrecía conforme aumentaba la profundidad, llegando a representar tan sólo un 35-40% de la población en profundidades superiores a 1000 m. Por el contrario, la abundancia relativa de las arqueas incrementa a partir de los 250 m de profundidad, llegando a ser tan abundantes como las bacterias a profundidades mayores de 1000 m (Karner et al., 2001).

Diversidad de virus marinos

De forma muy general podríamos definir a los virus como agentes infecciosos acelulares que poseen genomas formados por ácidos nucleicos (DNA o RNA) encapsulados en una estructura formada por proteínas (cápside). Recientemente, se ha propuesto un nuevo dominio biológico denominado *Akamara* para incluir estas formas de vida (Hurst, 2000). Dentro de este nuevo dominio se han propuesto dos reinos, *Euviria* (virus verdaderos) y *Viroidia* (viroides y virusoides), y una organización en phyla, clases, órdenes, géneros y especies similar a la del resto de seres vivos (Hurst, 2000).

En los ecosistemas pelágicos la abundancia de los virus generalmente aumenta con la productividad del sistema. Así, en ecosistemas marinos, la abundancia es mínima en profundidad (10^4 - 10^5 ml⁻¹), intermedia en aguas abiertas superficiales (10^5 - 10^6 ml⁻¹) y máxima en aguas costeras (10^6 - 10^7 ml⁻¹) (Paul, 2000). Normalmente existe una predominancia numérica de los virus sobre las bacterias, siendo entre 5 y 10 veces mayor el número de virus (Hara et al., 1996; Fuhrman, 2000). La mayor parte de éstos son fagos, es decir que infectan bacterias, por lo que tienen una gran influencia en los ciclos biogeoquímicos globales (Fuhrman, 1999), la diversidad microbiana (Wommack y Colwell, 2000) y el intercambio genético entre estos procariotas (Paul, 1999). A pesar de su importancia en el medio marino se sabe muy poco acerca de su diversidad y sus relaciones evolutivas (Fuller et al., 1998) ya que su estudio se ve dificultado por el hecho de que deben ser cultivados en su hospedador, y como se comentó anteriormente, la mayoría de estos hospedadores no pueden cultivarse en laboratorio. Además, los virus no contienen elementos genéticos como los genes ribosómicos que puedan utilizarse como marcadores de diversidad y distancia evolutiva (Rohwer y Edwards, 2002). Por ello, las técnicas moleculares en general, y en especial la aplicación de las técnicas de metagenómica (ver más adelante), han sido muy útiles para conocer más acerca de las comunidades virales acuáticas. En un estudio pionero sobre metagenómica de fagos marinos (Breitbart et al., 2002) se comprobó que un 65% de los genes analizados no se correspondían con ninguna de las secuencias conocidas y depositadas en las bases de datos existentes, lo que sugirió que la mayor parte de la diversidad de los fagos nos es completamente desconocida. En este mismo estudio, y mediante la aplicación de modelos matemáticos, se determinó que esta diversidad podría ser extremadamente elevada, pudiendo existir hasta 7000 tipos de virus distintos en el ecosistema marino. En la **Fig. 4** se puede observar la morfología típica de los fagos marinos y una bacteria infectada por un gran número de ellos.

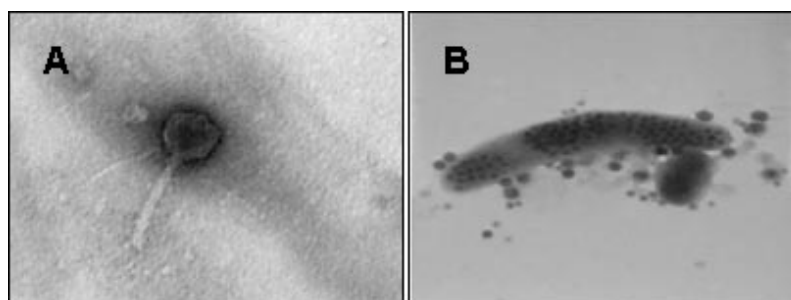


Figura 4. A) Microscopía electrónica de transmisión de un fago marino. B) Micrografía electrónica de transmisión de una célula bacteriana marina infectada con fagos. El diámetro medio de la cabeza de los virus es de alrededor de 35 nm.

Papel de los procariotas en la red trófica marina

En medios oceánicos el carbono orgánico disuelto (COD) es predominantemente consumido por las células bacterianas heterotróficas, que en última instancia son las responsables del consumo de alrededor del 50% de la producción primaria total en estos ecosistemas (Fuhrman y Azam, 1982; Azam et al., 1983). Aunque un 30% de los compuestos presentes en el COD no han sido identificados (Benner et al., 1992), se sabe que los componentes de la pared celular, las proteínas de membrana y los polisacáridos de origen bacteriano son constituyentes importantes del mismo (Nagata y Kirchman, 1997; McCarthy et al., 1998; Stoderegger y Herndl, 1998; Yamasaki et al., 1998). La mayor parte del ecosistema marino pelágico generalmente

no recibe aportes exógenos de nutrientes y por tanto las bacterias heterotróficas, limitadas en su crecimiento por el carbono disponible en el medio (Kirchman, 1990), dependen de la liberación del carbono asimilado por las bacterias fotosintéticas (cianobacterias) y otros organismos fitoplanctónicos eucariotas (McManus y Peterson, 1988; Kirchman et al., 1989; Billen et al., 1990).

Además, la mortalidad de los organismos presentes en el medio marino y la consiguiente liberación de sus componentes celulares al medio, es una fuente muy importante de carbono orgánico en el océano. En este sentido el papel que juegan los virus es crucial ya que su actividad lítica convierte las células infectadas en materia orgánica disuelta (Weinbauer, 2004). Los detritos producidos forman agregados (**Fig. 5**) que caen por gravedad a profundidades mayores, saliendo de la zona fótica. Se sabe que su composición química es heterogénea, con cantidades significativas de carbohidratos y proteínas que constituyen un microhábitat rico en nutrientes con concentraciones de carbono y nitrógeno varios órdenes de magnitud mayor que la encontrada en las aguas circundantes (Alldredge y Silver, 1988).

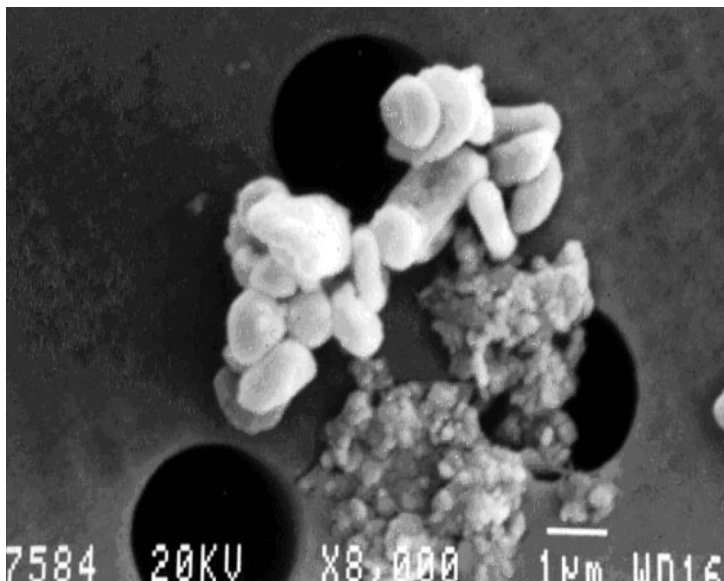


Figura 5. Microscopía electrónica de transmisión de un agregado marino (?marine snow?).

En estos agregados se han detectado elevadas tasas de producción primaria (Gotschalk y Alldredge, 1989) y se ha comprobado que las bacterias que en ellos se desarrollan suelen ser fácilmente cultivables y de tamaño mayor que las de vida libre (Eguchi y Kawai, 1992). Estos agregados podrían actuar como reservorio de nutrientes para las bacterias de vida libre, que tomarían su alimento directamente de ellos, aunque también se ha constatado que las células que forman parte de los agregados son responsables de la solubilización de las partículas de detritos mediante actividad exohidrolasa, produciendo la liberación de carbono orgánico al medio circundante (Cho y Azam, 1988; Smith et al., 1992). Los compuestos de bajo peso molecular solubilizados pueden ser entonces utilizados por la comunidad de bacterias pelágicas, que son las realmente oligotróficas. La diversidad filogenética en los agregados marinos ha sido estudiada mediante la amplificación de los genes ribosómicos 16S rRNA y comparada con la de las bacterias pelágicas (DeLong et al., 1993; Acinas et al., 1999). Los estudios demostraron que las células pelágicas pertenecían mayoritariamente al grupo anteriormente nombrado SAR11 de las α -*Proteobacteria*, grupo muy abundante y ubicuo en medios marinos, mientras que las agregadas estaban más relacionadas con el grupo CFB (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*) y con las γ -*Proteobacteria*. El grupo CFB se caracteriza por ser muy diverso, tanto morfológica como fisiológicamente. La mayoría de los aislados de este grupo son aerobios estrictos o anaerobios quimioautótrofos facultativos y son importantes por su capacidad de degradar biomacromoléculas tipo quitina, agar, DNA o celulosa (Reysenbach, 1992). La subclase γ -*Proteobacteria* engloba microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, gram-negativos, quimiorganótrofos, móviles por flagelos y, en general, son fácilmente cultivables en laboratorio.

En cuanto a las bacterias marinas pelágicas que no forman agregados, se sabe que gran parte de ellas se incluyen dentro de las ultramicrobacterias, las formas celulares más pequeñas conocidas que, sin embargo, presentan una mayor actividad metabólica por unidad de volumen celular que las células de gran tamaño. Estas ultramicrobacterias constituyen el principal componente de los procariotas marinos, tanto en términos de actividad como de biomasa total (Schut et al., 1997).

Genómica y metagenómica en ambientes marinos

El hecho, ya comentado, de que las condiciones que prevalecen en los medios marinos sean difíciles de reproducir en laboratorio provoca que un elevadísimo porcentaje de estas bacterias (hasta un 99%) no haya podido ser cultivado, y por tanto se desconozca qué papel ecológico juegan de manera individual. Pero hoy en día es posible también abordar el estudio de la dinámica de un ecosistema natural a nivel genómico. Estas técnicas permiten estudiar un ecosistema desde dos puntos de vista: (1) La primera aproximación consiste en la secuenciación completa de los genomas de organismos individuales que se sabe juegan un papel ecológico relevante en su ambiente natural. Mediante el análisis de los genomas completos se puede intentar reconstruir el funcionamiento de los microorganismos, así como su potencial fisiológico y metabólico, y relacionarlo con los compuestos existentes en el ambiente en el que se desarrollan. Actualmente existen alrededor de 3500 genomas secuenciados o en proyecto de secuenciación, de los cuales 866 pertenecen a eucariotas, 825 a bacterias, 60 a arqueas, 242 a fagos y 1549 a otros tipos de virus. Sin embargo, esta aproximación que parece ser apropiada para el estudio de bacterias patógenas, desarrollo de vacunas y producción de compuestos de interés biotecnológico, no siempre es válida para estudios ambientales ya que en la mayor parte de los procesos naturales están implicadas comunidades mixtas de microorganismos con relaciones de elevada complejidad. (2) La segunda aproximación consiste en el análisis de la comunidad completa mediante el estudio de los denominados metagenomas (**Fig. 6**).

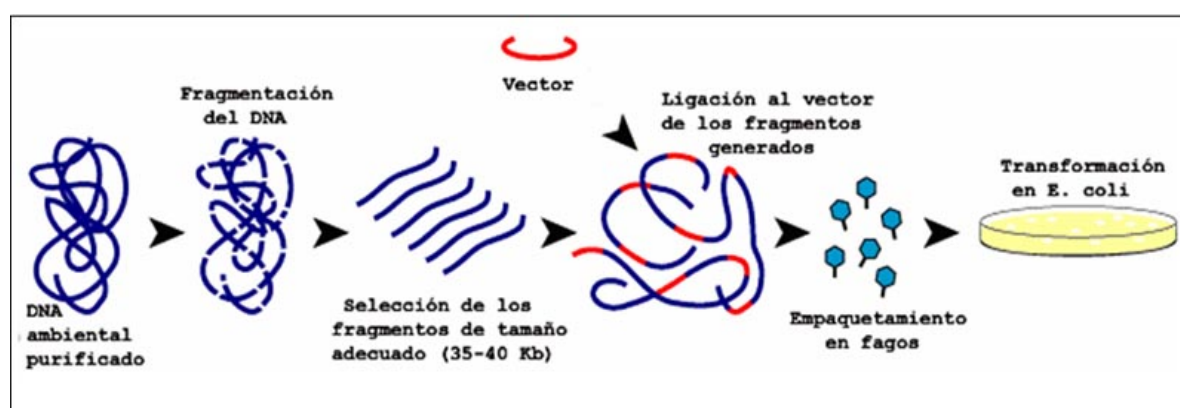


Figura 6. Esquema general de la producción de librerías metagenómicas mediante la utilización de fagos para el empaquetamiento del DNA y la infección de células competentes.

Las moléculas de DNA extraídas a partir de muestras naturales (DNA procedente, en principio, de todos los genomas de la muestra cuya suma constituye el metagenoma de la misma) son secuenciadas tras ser clonadas en vectores con capacidad de incorporar insertos de DNA de gran tamaño, tales como cósmidos o BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) (Rondon et al., 2000). El primer trabajo realizado mediante el estudio de metagenomas en un ambiente natural consistió en la descripción de la comunidad microbiana de un biofilm desarrollado sobre mineral de pirita en una mina subterránea de California (Tyson et al., 2004). Gracias a la baja diversidad de especies presentes en la muestra, los autores fueron capaces de reconstruir el genoma completo de los dos microorganismos mayoritarios presentes en esta muestra. El análisis de los fragmentos genómicos obtenidos reveló algunas tendencias interesantes que, aparentemente, reflejaban el funcionamiento global del biofilm. Pero aunque estas reconstrucciones metabólicas son extremadamente importantes para el conocimiento de cualquier ecosistema natural, no parecen ser apropiadas para el estudio de comunidades más complejas, difícilmente abordable desde esta perspectiva.

En este sentido, la secuenciación de $1,6 \times 10^9$ pares de bases de DNA procedente de muestras del Mar de los Sargazos (Venter et al., 2004) ha supuesto uno de los proyectos más ambiciosos llevados a cabo en ambientes marinos. Un total de 1,045 millones de bases se secuenciaron, anotaron y analizaron para la elucidación del contenido genético de la muestra marina, su diversidad microbiana y la abundancia relativa de los microorganismos representados en ella. Los autores identificaron 1,2 millones de genes que estimaron provenían de unas 1800 especies procarióticas (incluyendo 148 filotipos bacterianos nuevos). Además, pudieron establecerse algunas conclusiones preliminares con respecto a los ciclos biogeoquímicos y los microorganismos implicados en ellos. En cuanto a los procesos de nitrificación en el océano, se descubrió que no solamente miembros del Dominio *Bacteria* podrían estar implicados, ya que se encontró el gen de la amoníaco monooxigenasa en un fragmento genómico perteneciente a una arquea. Los mecanismos de transporte de los fosfonatos, recientemente identificados en los genomas completos de las cianobacterias *Prochlorococcus* y *Synechococcus* (Palenik et al., 2003; Rocap et al., 2003), aparecieron en esta librería genómica junto con un gran número de genes responsables de la utilización de polifosfatos y pirofosfatos, demostrando que una gran variedad de microorganismos presentes en la muestra poseen mecanismos que les permiten utilizar la forma dominante de fósforo en el Mar de los Sargazos.

Es obvio que este tipo de estudios son muy preliminares y están en fase de desarrollo, pero también es cierto que han abierto una puerta a muchos estudios de expresión y fisiología, que en el futuro podrían darnos las claves del funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos más importantes que se dan en nuestro planeta. La tendencia actual en ecología microbiana es pues la combinación de las técnicas tradicionales de cultivo, las técnicas moleculares y las de metagenómica para abordar el estudio de la diversidad metabólica y fisiológica de las muestras naturales. Estos estudios, junto con la aplicación de técnicas analíticas, nos permitirán conocer más en detalle los procesos biogeoquímicos en general, y los oceánicos en particular.

¿Hay más microorganismos en el mar que estrellas en el universo? (Copley, 2002) y esta es razón suficiente para asumir que su estudio es clave para entender la dinámica global de nuestro planeta.

Referencias

- Acinas, S.G., Antón, J., y Rodríguez-Valera, F. 1999. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore Western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 65: 514-522.
- Allredge, A.L., y Silver, M.W. 1988. Characteristics, dynamics, and significance of marine snow. *Prog Oceanogr* 20: 41-82.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.g., Meyer-Reil, R.A., y Thingstad, F. 1983. The cycling of organic matter by bacterioplanktonic pelagic marine systems: Microenvironmental considerations. In M. J. R. Fashman ed., *Flows of Energy and Materials in Marine Ecosystems: Theory and Practice*. NATO Conference Series 4, Marine Sciences. Plenum Press, New York, pp. 345-360.
- Bano, N., y Hollibaugh, J.T. 2002. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl Environ Microbiol* 68: 505-518.
- Benner, R., Pakulski, J.D., McCarthy, M., Hedges, J.I., y Hatcher, P.G. 1992. Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science* 255: 1561-1564.
- Bianchi, A., y Giuliano, L. 1996. Enumeration of viable bacteria in the marine pelagic environment. *Appl Environ Microbiol* 62: 174-177.
- Billen, G., Joiris, C., Meyer-Reil, L., y Lindeboom, H. 1990. Role of bacteria in the North Sea ecosystem. *Neth J Sea Res* 26: 265-293.
- Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., Mahaffy, J.M., Segall, A.M., Mead, D. et al. 2002. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14250-14255.
- Button, D.K., Schut, F., Quang, P., Martin, R., y Robertson, B.R. 1993. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl Environ Microbiol* 59: 881-891.
- Cho, B.C., y Azam, F. 1988. Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature* 332: 441-443.
- Connon, S.A., y Giovannoni, S.J. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microbiol* 68: 3878-3885.
- Copley, J. 2002. All at sea. *Nature* 415: 572-574.
- DeLong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5685-5689.
- DeLong, E.F. 2003. Oceans of Archaea. *ASM News* 69: 503-511.
- DeLong, E.F., Franks, D.G., y Allredge, A.L. 1993. Phylogenetic diversity of aggregates-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol Oceanogr* 38: 924-934.
- DeLong, E.F., Taylor, L.T., Marsh, T.L., y Preston, C.M. 1999. Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 65: 5554-5563.

- Dortch, Q., y Packard, T.T. 1989. Differences in biomass structure between oligotrophic and eutrophic marine ecosystems. *Deep Sea Res* 36: 223-240.
- Eguchi, M., y Kawai, A. 1992. Distribution of oligotrophic and eutrophic bacteria in fish culturing inland bays. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 119-125.
- Fenchel, T., y Blackburn, T.H. 1998. Bacterial biogeochemistry: the ecophysiology of mineral cycling. *Academia Press*, san Diego, CA.
- Field, K.G., Gordon, D., Wright, T., Rappe, M., Urback, E., Vergin, K., y Giovannoni, S.J. 1997. Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63: 63-70.
- Fry, J.C. 1990. Microbiology of extreme environments. Open University Press, Milton Keynes: 93-116.
- Fuhrman, J. 2000. Impact of viruses on bacterial processes. In *Microbial Ecology of the Oceans* (Kirchman, D., Ed.), Wiley-Liss.: 277-350.
- Fuhrman, J.A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399: 541-548.
- Fuller, N.J., Wilson, W.H., Joint, I.R., y Mann, N.H. 1998. Occurrence of a sequence in marine cyanophages similar to that of T4 g20 and its application to PCR-based detection and quantification techniques. *Appl Environ Microbiol* 64: 2051-2060.
- Fuhrman, J.A., y Azam, F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar Biol* 66: 109-120.
- Fuhrman, J.A., McCallum, K., y Davis, A.A. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* 356: 148-149.
- Fuhrman, J.A., Lee, S.H., Masuchi, Y., y Davis, A.A. 1994. Characterization of marine prokaryotic communities via DNA and RNA. *Microb Ecol* 28: 133-145.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., y Field, K.G. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60-63.
- Giovannoni, S.J., Rappe, M.S., Vergin, K.L., y Adair, N.L. 1996. 16S rRNA genes reveal stratified open ocean bacterioplankton populations related to the Green Non-Sulfur bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7979-7984.
- Gotschalk, J.M., y Alldredge, A.L. 1989. Enhanced primary production and nutrient regeneration within aggregated marine diatoms: implications for mass flocculation of diatom blooms. *Mar Biol* 103: 119-130.
- Hara, S., Koike, I., Terauchi, K., Kamiya, H., y Tanoue, E. 1996. Abundance of viruses in deep oceanic waters. *Mar Ecol Prog Ser* 145: 269-277.
- Hurst, C. 2000. An introduction to viral taxonomy and the proposal of Akamara, a potential domain for the genomic acellular agents. In: *Viral Ecology* (Hurst, C., Ed.) Academic Press, San Diego.: 41-62.
- Karner, M.B., DeLong, E.F., y Karl, D.M. 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409: 507-510.
- Kirchman, D.L. 1990. Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter in the subarctic Pacific. *Mar Ecol Prog ser* 62: 47-54.
- Kirchman, D.L., Keil, R.G., y Wheeler, P.A. 1989. The effect of amino acids on ammonium utilization and regeneration by heterotrophic bacteria in the subarctic Pacific. *Deep Sea Res* 36: 1763-1776.
- López-García, P., López-López, A., Moreira, D., y Rodríguez-Valera, F. 2001. Diversity of free-living prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic Polar Front. *FEMS Microbiol Ecol* 36: 193-202.

- Marie, D., Brussaard, C., Thyraug, R., Bratbak, G., y Vaulot, D. 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 65: 457-52.
- Massana, R., Murray, A.E., Preston, C.M., y DeLong, E.F. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol* 63: 50-56.
- McCarthy, M.D., Hedges, J.I., y Benner, R. 1998. Major bacterial contribution to marine dissolved organic nitrogen. *Science* 281: 231-234.
- McManus, G.B., y Peterson, W.T. 1988. Bacterioplankton production in the nearshore zone during upwelling off central Chile. *Mar ecol Prog ser* 43: 11-17.
- Morita, R.Y. 1982. Starvation survival of heterotrophs in the marine environment. *Adv Microb Ecol* 6: 171-198.
- Morris, R.M., Rappe, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Slebold, W.A., Carlson, C.A., y Giovannoni, S.J. 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* 420: 806-809.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology*. 24: 17-27.
- Nagata, T., y Kirchman, D. 1997. Roles of submicron particles and colloids in microbial food webs and biogeochemical cycles within marine environments. *Adv Microb Ecol* 15: 81-103.
- Olsen, G.J., Lane, D.L., Giovannoni, S.J., y Pace, N.R. 1986. Microbial Ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann Rev Microbiol* 40: 337-365.
- Pace, N.R. 1986. The analyses of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv Microb Ecol* 9: 1-55.
- Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740.
- Palenik, B., Brahamsha, B., Larimer, F.W., Land, M., Hauser, L., y Chain, P. 2003. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* 424: 1037-1042.
- Paul, J. 2000. Ecology of bacteriophages in nature. In: *Viral Ecology* (Hurst, C., Ed.) Academic Press, San Diego.: 211-246.
- Paul, J.H. 1999. Microbial gene transfer: an ecological perspective. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 45-50.
- Pinhassi, J., Zweifel, U.L., y Hagstrom, A. 1997. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63: 3359-3366.
- Preston, C.M., Wu, K.Y., Molinski, T.F., y DeLong, E.F. 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6241-6246.
- Rappé, M., Connon, S.A., Vergin, K.L., y Giovannoni, S.J. 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton. *Nature* 418: 630-633.
- Rappé, M.S., y Giovannoni, S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* 57: 369-394.
- Rehnstam, A.S., Bäckman, S., Smith, D.C., Azam, F., y Hagström, A. 1993. Blooms of sequence-specific culturable bacteria in the sea. *FEMS Microbiol Ecol* 102: 161-166.
- Reysenbach, H. 1992. The order Cytophagales. In A. Barlows et al., eds., *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York.: 3631-3675.
- Rocap, G., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N.A. et al. 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424: 1042-1047.
- Rohwer, F., y Edwards, R. 2002. The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *J Bacteriol* 184: 4529-4535.

- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R. et al. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 66: 2541-2547.
- Schmidt, T.M., DeLong, E.F., y Pace, N.R. 1991. Analyses of marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol* 173: 4371-4378.
- Schut, F., Prins, R.A., y Gottschal, J.C. 1997. Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquat Microbial Ecol* 12.: 177-202.
- Smith, D.C., Simon, M., Alldredge, A.L., y Azam, F. 1992. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 359: 139-142.
- Stackebrandt, E., y Goebel, B. 1994. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846-849.
- Stoderegger, K., y Herndl, G.J. 1998. Production and release of bacterial capsular material and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. *Limnol Oceanogr* 43: 877-884.
- Suzuki, M.T., Rappe, M.S., Haimberger, Z.W., Winfield, H., Adair, N., Strobel, J., y Giovannoni, S.J. 1997. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl Environ Microbiol* 63: 983-989.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E., Ram, R.J., y Richardson, P.M. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428: 37-43.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., y Eisen, J.A. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.
- Weinbauer, M.G. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* 28: 127-181.
- Woese, C.R., O., K., y Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci* 97: 4576-4579.
- Wommack, K.E., y Colwell, R.R. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 69-114.
- Yamasaki, A., Fukuda, H., Fukuda, R., Miyajima, T., Nagata, T., Ogawa, H., y Koike, I. 1998. Submicrometer particles in the northwest Pacific coastal environments: abundance, size distribution, and biological origins. *Limnol Oceanogr* 43: 536-542.